

BRUNA MARIA COVRE GARCIA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ANTICARIOGÊNICO IN SITU DE SISTEMAS
ADESIVOS CONTENDO FLUOR E MDPB**

CAMPINAS
2008

BRUNA MARIA COVRE GARCIA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ANTICARIOGÊNICO IN SITU DE SISTEMAS
ADESIVOS CONTENDO FLUOR E MDPB**

Dissertação apresentada ao Centro de Pós-Graduação / CPO São Leopoldo Mandic, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística.

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Tarkany Basting Hofling.

CAMPINAS
2008

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca "São Leopoldo Mandic"

Si585a Silva, Bruna Maria Covre Garcia da.
Avaliação do efeito do anticariogênico in situ de sistemas adesivos contendo fluor e MDPB / Bruna Maria Covre Garcia da Silva. – Campinas: [s.n.], 2008.
49f.: il.

Orientador: Roberta Tarkany Basting Hofling.
Dissertação (Mestrado em Dentística) – C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação.

1. Cariogênicos. 2. Adesivos dentinários. 3. Flúor. 4. Estética dentária. I. Hofling, Roberta Tarkany Basting. II. C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação. III. Título.

**C.P.O. - CENTRO DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS
SÃO LEOPOLDO MANDIC**

Folha de Aprovação

A dissertação intitulada: “**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ANTICARIOGÊNICO IN SITU DE SISTEMAS ADESIVOS CONTENDO FLUOR E MDPB**” apresentada ao Centro de Pós-Graduação, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração: _____ em __/__/__, à comissão examinadora abaixo denominada, foi aprovada após liberação pelo orientador.

Prof. (a) Dr (a)
Orientador

Prof. (a) Dr (a)
1º Membro

Prof. (a) Dr (a)
2º Membro

*Dedico este trabalho à minha família,
com enorme gratidão pela compreensão,
pelos estímulos que me fizeram buscar vida nova a cada dia.*

*Meus agradecimentos,
por terem compreendido minha ausência,
concedendo a mim a oportunidade de alcançar meus objetivos.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Roberta Tarkany Basting pela confiança em mim depositada, pelo incentivo e dedicação em todos os momentos durante os anos em que estivemos juntas.

À Profa. Dra. Flávia Martão Flório pela espontaneidade e empenho em realizar a análise estatística do trabalho realizado.

À Pró-Reitora de pesquisas do Centro de Pós-Graduação São Leopoldo Mandic, Profa. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo.

À Tatiana Ricci pelo carinho e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, funcionários e amigos do Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic.

Ao Prof. Dr. Marcelo Gianinni pela prontidão e gentileza prestada em disponibilizar material fundamental para esta pesquisa.

À Faculdade e aos alunos de Odontologia de Araras pelo respeito e oportunidade concedida.

A FAPESP pelo apoio financeiro à pesquisa, processo número 06/61113-3.

À minha família que permaneceu sempre ao meu lado em todos os momentos, especialmente meus pais e meu esposo.

À minha filha Ana Clara pela ausência e impaciência em alguns momentos.

E, finalmente, a Deus pela oportunidade de realizar e concluir mais uma etapa de minha vida, com saúde e cercada das pessoas que mais amo, minha família.

O segredo é não correr atrás das
borboletas...
É cuidar do jardim para que elas venham
até você!

Mário Quintana

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar *in situ* o efeito anticariogênico de sistemas adesivos contendo flúor e MDPB na interface restauradora através de testes de microdureza. Cento e vinte fragmentos contendo preparos na junção amelo-cementária para restaurações em resina composta foram divididos aleatoriamente entre os sistemas adesivos a serem testados. Os adesivos foram aplicados de acordo com as instruções do fabricante: Optibond FL (Kerr Corp., Orange, CA, United States), Adper Single Bond 2 (3M ESPE, Irvine, CA, United States), Prime & Bond 2.1 (DENTSPLY De Trey GmbH, Konstanz, Germany), Optibond Solo Plus (Kerr Corp., Orange, CA, United States), Adper Prompt (3M ESPE, Seefeld, Germany), Clearfil Protect Bond (Kuraray Medical Co., Ltd., Kurashiki, Okayama, Japan) e restaurados com resina composta nanoparticulada Z350 (3M ESPE, Irvine, CA, United States). Vinte voluntários utilizaram dispositivos palatinos contendo fragmentos restaurados com cada sistema adesivo por 21 dias, e aplicavam sacarose 20% oito vezes ao dia sob os mesmos para simular uma situação de alto desafio cariogênico. Testes de microdureza foram realizados em diferentes profundidades (20 μ , 40 μ e 60 μ da margem oclusal da restauração) e em diferentes distâncias (100 μ , 200 μ e 300 μ da interface adesiva). A Análise de Variância mostrou que, para esmalte, houve diferença significativa entre os sistemas adesivos ($p=0,0106$) e a interação sistema adesivo*distância foi significativa ($p=0,0006$) e o sistema adesivo autocondicionante de um passo contendo flúor (Adper Prompt - 3M ESPE, Seefeld, Germany) apresentou o melhor efeito anticariogênico. Entretanto, para dentina, não houve interferência do sistema adesivo utilizado em minimizar a severidade da lesão de cárie secundária.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate in situ the anticariogenic effect of fluoride and MDPB containing adhesive systems at the restoration interface by microhardness tests. One hundred and twenty fragments containing preparations performed at the amelo-cement junction for resin composite restorations were randomly distributed among the adhesive systems to be tested. The adhesive systems were applied in accordance with the manufacturers' instructions: Optibond FL (Kerr Corp., Orange, CA, United States), Adper Single Bond 2 (3M ESPE, Irvine, CA, United States), Prime & Bond 2.1 (DENTSPLY De Trey GmbH, Konstanz, Germany), Optibond Solo Plus (Kerr Corp., Orange, CA, United States), Adper Prompt (3M ESPE, Seefeld, Germany), Clearfil Protect Bond (Kuraray Medical Co., Ltd., Kurashiki, Okayama, Japan) and restored with the nanoparticulate resin composite Z350 (3M ESPE, Irvine, CA, United States). Twenty volunteers used a palatal appliance containing fragments restored with each adhesive system for 21 days, and applied 20% sucrose 8 times a day on then to simulate a high cariogenic challenge. Microhardness tests were performed at different depths (20µm, 40µm and 60µm from the occlusal margin of the restoration) and at different distances (100µm, 200µm and 300µm from the adhesive interface). Analysis of Variance showed that for enamel there was significant difference between the adhesive systems ($p=0.0106$) and the interaction adhesive system*distance was significant ($p=0.0006$) and the one-step self-etching adhesive system containing fluoride (Adper Prompt - 3M ESPE, Seefeld, Germany) presented higher anticariogenic effect. However, for dentin there was no interference of the adhesive system used in decreasing the severity of secondary caries lesion.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 Incorporação de agentes antimicrobianos a materiais restauradores	10
2.2 Interação dos agentes antimicrobianos com o substrato	14
2.3 Monômero antibacteriano (MDPB).....	19
2.4 Biofilme	22
3 PROPOSIÇÃO	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
5 RESULTADOS.....	33
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	45
ANEXO B - Instruções aos Voluntários.....	47
ANEXO C - Aprovação do Comitê de Ética	49

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de materiais restauradores adesivos tem permitido a utilização de técnicas conservadoras para a restauração das superfícies dentais. Conseqüentemente, preparos cavitários extensos designados a promover resistência mecânica e retenção têm sido gradualmente modificados para procedimentos de mínima remoção para manter a integridade das estruturas dentais. Entretanto, mesmo com esta proposta conservadora, outros problemas relacionados com restaurações ainda existem como microinfiltração e cárie secundária (Mjör, Toffenetti, 2000). O selamento da interface dente/restauração é um pré-requisito para a longevidade clínica das restaurações adesivas (Bergenholtz et al., 1982; Brännström, 1986; Grieve et al., 1991). Assim, materiais restauradores ou intermediários com propriedades antibacterianas podem ser utilizados para inibir o desenvolvimento de lesões de cárie (Rawls, 1991).

Neste aspecto, sistemas adesivos que apresentam atividade antibacteriana, ou que liberem flúor podem ser úteis para prevenir cárie secundária (Bapna et al., 1988; Imazato et al., 1994; Walshaw, McComb, 1994; Imazato et al., 1997; Imazato et al., 1998; Itota et al., 2002; Imazato et al., 2003; Nakajima et al., 2003; Doi et al., 2004). A incorporação do monômero antibacteriano MDPD (12-metacriloiloxidodecilpiridínio bromato), sintetizado a partir da substituição do quaternário de amônia de um agente antibacteriano por 10% do fosfato terminal do 10-metacriloiloxidodecil dihidrogênio fosfato (MDP) (Doi et al., 2004), também é um componente efetivo, proporcionando ao primer atividade antimicrobiana antes e depois da reação de presa do material (Imazato et al., 1997, 1998). Através da microscopia eletrônica de varredura da interface resina/dentina é possível observar

existe a existência da formação de gaps entre a resina e o primer, ou entre o adesivo e a camada híbrida (Walshaw, McComb, 1994; Perdigão et al., 1996), a incorporação do MDPB nas resinas pode ser considerada efetiva para promover um efeito antibacteriano pós-cura contra a invasão bacteriana e, em combinação com primer e adesivo contendo MDPB, poderão ser úteis para a obtenção de restaurações com menor probabilidade de lesões de cárie secundárias.

Dentre os materiais restauradores contendo flúor, os sistemas adesivos dentais parecem ser especialmente atrativos, porque não estão somente em contato íntimo, mas parcialmente difusos entre as margens dentinárias da restauração (Ferracane et al., 1998; Han et al., 2002). A liberação de íons flúor do sistema adesivo pode inibir o desenvolvimento de cárie secundária através da inibição da desmineralização e promoção da remineralização de dentina afetada ao redor da restauração (Itota et al., 2002). Alguns estudos mostraram que apesar da quantidade de flúor liberada dos adesivos dentais parecerem insuficientes para prevenir cárie secundária em dentina, a presença do flúor deve ter relação com o aumento da resistência ácida das margens cavitárias, capaz de manter a integridade das paredes cavitárias (Walshaw, McComb, 1994; Perdigão et al., 1996; Mitchem, Adey, 1998; Han et al., 2002; Itota et al., 2002; Imazato et al., 2003; Nakajima et al., 2003). Em estudos *in vitro*, os materiais que liberam flúor são efetivos na inibição de cárie secundária (Han et al., 2002), porém, as variáveis testadas nessas pesquisas diferem das condições encontradas no meio bucal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Incorporação de agentes antimicrobianos a materiais restauradores

Addy & Handley (1981) determinaram os efeitos da evaporação da água e a perda de peso provocada pela incorporação do acetato do clorexidine em uma resina acrílica termopolimerizável e em um gel acrílico. A dureza e a medida transversal da curvatura foram feitas de maneira similar para acrílicos polimerizados com calor e a frio. Os espécimes foram embebidos em água por 87 dias e aqueles polimerizados pelo calor demonstraram um ganho inicial de peso seguido por uma perda progressiva. Através de medições constantes do peso dos espécimes foi revelado que houve perdas de peso significativamente maiores comparado aos espécimes do grupo controle. Entretanto estas perdas de peso foram menores nos grupos onde a clorexidine foi adicionada em concentrações 5 e 10%. A dureza e o módulo de elasticidade foram reduzidos significativamente para o acrílico contendo clorexidine polimerizado pelo calor e a frio. As mudanças nas propriedades observadas nos materiais poderiam ser consistentes com o teste padrão da incorporação da clorexidine na matriz.

Imazato et al. (1994) estudaram a habilidade de compósitos contendo MDPB na inibição do crescimento e acúmulo de placa por *Streptococcus mutans in vitro*, a liberação dos componentes antibacterianos dos materiais e a influência da incorporação do MDPB sobre as propriedades mecânicas do compósito estudado. Foram utilizadas seis espécies de streptococcus orais. A atividade antibacteriana do MDPB foi investigada através de uma série de microdiluições (mínima concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano) do MDPB não polimerizado comparado com o triclosan. Após a fotopolimerização da resina contendo MDPB, não foi

observada a liberação de nenhum dos componentes do material, mesmo após 90 dias de imersão dos espécimes em água e outros solventes. O *Streptococcus mutans* se acumulou sobre a superfície da resina contendo o monômero bacteriano porém, em menor grau que o grupo controle. A incorporação do MDPB não exerce influencia significativa sobre as propriedades mecânicas do compósito.

Itota et al. (2002) avaliaram o efeito da liberação de flúor de adesivos na inibição de cárie secundária em lesões externas e de parede. Preparos de classe V foram realizados em pré-molares humanos e restaurados com várias combinações entre os materiais em estudo (três sistemas adesivos, sendo dois deles liberadores de flúor e três materiais restauradores, sendo dois deles não liberadores de flúor). Os dentes restaurados foram incubados em um meio bacteriano contendo sacarose com *Streptococcus mutans* por 14 dias. Microradiografias foram utilizadas para demonstrar que os espécimes não apresentaram lesões de parede em nenhum dos grupos. Os resultados indicaram que a liberação de flúor dos adesivos é efetiva na prevenção de lesões de parede, mas exibem pequena atividade inibitória em lesões externas.

Imazato (2003) avaliou as propriedades antibacterianas de resinas e sistemas adesivos. Alguns produtos disponíveis comercialmente incluindo os materiais liberadores de flúor não apresentam efeito antibacteriano depois de polimerizados, o que pode explicar o motivo pelo qual os compósitos acumulam mais placa do que os outros materiais de preenchimento. Os produtos que contém glutaraldeído ou que apresentam propriedades ácidas exibem alguns efeitos antibacterianos. Entretanto, as propriedades antibacterianas desses produtos não são somente derivadas os constituintes incluídos para produzir características

adesivas melhores. A evolução dos compósitos bio-funcionais ou dos sistemas adesivos com efeitos terapêuticos podem contribuir para prevenir cárie secundária.

Nakajima et al. (2003) estudaram através de testes de resistência a microtração a durabilidade de sistemas adesivos sem flúor e contendo flúor aplicados em dentina humana *in vitro*. Os dentes foram restaurados e seccionados em fatias de 1mm² na região da interface adesiva. Os espécimes foram divididos em dois grupos: 3 e 6 meses, onde a metade deles foi totalmente recoberta com esmalte de unha, enquanto que a outra metade foi incubada em água a 37°C sem a proteção do verniz. A microtração foi realizada após 1 dia de armazenamento e não mostrou haver diferenças entre os espécimes protegidos e não protegidos com o verniz. As médias de resistência dos espécimes restaurados com a resina contendo flúor, porém, não protegidos, não mudou ao longo dos 3 e 6 meses. Os resultados indicaram que a diminuição na resistência de união dos espécimes depende da presença da água mas, pode ser prevenida com o uso de resinas contendo flúor.

Cal et al. (2005) investigaram o efeito de um sistema adesivo contendo monômero antibacteriano (MDPB) à dentina na resistência ao cisalhamento de restaurações de cerâmica pura (IPS Empress 2) cimentadas com dois diferentes sistemas de polimerização dual (Variolink 2, de RelyX, ARC e Panavia F 2.0). Discos de cerâmica pura foram fabricados e limpos com ultrassom. A superfície vestibular de 108 pré-molares humanos hígidos foi desgastada para expor a dentina e em seguida foram polidos com lixas de granulação 600. Foram utilizados três sistemas para cimentação de polimerização tipo dual (n=36). O grupo controle recebeu procedimentos de adesão de acordo com as instruções do fabricante de cada sistema adesivo. Depois que as amostras de cerâmica pura foram cimentadas ao dente, foram submetidos a 5000 ciclos de termociclagem. O teste de resistência ao

cisalhamento foi realizado utilizando a máquina de ensaios universal Shimadzu até a falha. A análise das superfícies fraturadas de dentina foi executada usando o microscópio ótico em x10 e as ampliações x1000 e as imagens foram analisadas com analisador de imagem. Através da análise dos dados (ANOVA) e o teste de Bonferroni, os resultados indicaram que a aplicação do adesivo antibacteriano aumentou a resistência de união dos três sistemas de cimentação de polimerização dual à dentina. A análise da superfície mostrou que na maioria dos espécimes o tipo de fratura ocorrido foi o adesivo entre a dentina e o agente de cimentação. O sistema adesivo antibacteriano Clearfil Protect Bond pode ser usado seguramente na prevenção do risco de complicações resultante da atividade bacteriana sem afetar a resistência de união de restaurações em IPS Empress 2 cimentadas com sistemas de cimentação de polimerização dual.

Itota et al. (2005) investigaram *in vitro* os efeitos na inibição de cárie secundária de sistemas adesivos de dois passos ao redor de materiais liberadores de flúor. Foram utilizados dois sistemas adesivos autocondicionantes e dois sistemas adesivos convencionais (condicionamento ácido + técnica da dentina úmida) e resina composta com e sem liberação de flúor. Foram confeccionados preparos de classe V em pré-molares humanos e restaurados com materiais combinados. Após 14 dias de armazenamento, os dentes foram incubados em meio bacteriano contendo sacarose com *Streptococcus mutans* por 2 semanas. A perda e o ganho de água dos adesivos e a liberação de flúor foi determinada. Os grupos de sistemas adesivos convencionais mostraram maior liberação de flúor quando comparados com os sistemas autocondicionantes.

2.2 Interação dos agentes antimicrobianos com o substrato

Bergenholtz et al. (1982) revelaram que a quantidade de bactérias presentes na base de restaurações de classe V está diretamente relacionada com o tipo de medicamento utilizado. Dos materiais estudados: resina, amálgama, silicato e guta-percha foi observado que em cada um deles foi encontrado diferentes números de colônias bacterianas, considerando que o cimento de óxido de zinco e eugenol não apresentou nenhuma formação.

Ten Cate & van Duinen (1995), em pesquisas anteriores, mostraram haver liberação de flúor das restaurações do cimento de ionômero de vidro (CIV) nos fluídos orais. O flúor presente nos fluídos tem efeito preventivo de cárie pela remineralização e inibindo a desmineralização dos tecidos dentais duros. Conseqüentemente, as pesquisas atuais foram realizadas com o objetivo de determinar se o CIV utilizado como material de preenchimento poderia contribuir com a remineralização de lesões de cárie em dentina. Preparos foram confeccionados em discos de dentina contendo lesões de cárie incipiente. Os preparos foram preenchidos com amálgama ou materiais compostos (como controle) ou com o CIV. Os espécimes foram colocados nas superfícies vestibulares de próteses parciais removíveis e foram mantidos em ambiente oral dos voluntários por um período experimental de 12 semanas, em seguida os espécimes foram seccionados e analisados através de microradiografias. Todos os espécimes com restaurações de CIV exibiram hipermineralização dos tecidos ao redor dos materiais de preenchimento e na parede do preparo que esteve em contato com a restauração. As lesões foram remineralizadas, mesmo sob condições severas de formação de placa. Ao contrário, os espécimes com amálgama ou as restaurações com compósitos mostraram desmineralização extensa. Os resultados do estudo

mostraram que o material restaurador liberador de flúor (CIV) demonstra potencial remineralizador significativo. Conseqüentemente, a escolha do material restaurador pode ser crucial para a ocorrência ou a prevenção de cárie recorrente ao redor das restaurações.

Perdigão et al. (1996) investigaram a interação entre a dentina e sistemas adesivos experimentais e comerciais *in vivo*. Os sistemas adesivos foram aplicados em cavidades classe I em pré-molares humanos combinados com 2 resinas (1 autopolimerizável e 1 fotopolimerizável) e depois foram extraídos e fixados em glutaraldeído 2,5%. Os espécimes foram desidratados, seccionados e processados para a análise através da microscopia eletrônica de varredura. Alguns sistemas adesivos não formaram uma fina camada sobre a dentina, por outro lado o compósito resinoso não penetrou nos túbulos dentinários.

Pashley & Tay (2001) examinaram a agressividade de três sistemas adesivos autocondicionantes na penetração da lama dentinária de diferentes espessuras através do uso da microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Discos de dentina foram produzidos com terceiros molares humanos extraídos. Para o grupo controle, a superfície de dentina média foram criofraturadas para criar uma superfície de adesão que fosse desprovida de lama dentinária. Os dentes polidos com lixa de granulação 600 para produzir superfícies de adesão polidas e com camadas estreitas de lama dentinária. Os espécimes foram restaurados com os três diferentes sistemas adesivos autocondicionantes e em seguida foram desmineralizados e embutidos em resina epóxica para a observação em microscopia eletrônica de varredura. Os sistemas adesivos autocondicionantes podem ser classificados como suaves, moderados e agressivos baseados em sua habilidade de penetração através da camada de lama dentinária e sua profundidade de

desmineralização na dentina subsuperficial. O sistema mais agressivo solubilizou completamente a camada de lama dentinária e seus *plugs* e foi capaz de formar camadas híbridas com uma espessura que aproxima aquelas obtidas em dentina condicionada com ácido fosfórico.

Tay & Pashley (2001) investigaram a agressividade de três sistemas adesivos autocondicionantes ao esmalte. As características ultraestruturais e a resistência à microtração foram examinadas. Para a avaliação através da microscopia eletrônica de varredura foram utilizados fragmentos dentais da face vestibular, da porção média da coroa do esmalte que foram restaurados com diferentes materiais. Todos os espécimes do grupo controle foram condicionados com ácido fosfórico 32% e na seqüência os sistemas autocondicionantes foram aplicados de acordo com os fabricantes. Completamente desmineralizados, réplicas em resina foram embutidas em resina epóxica para avaliação da extensão da infiltração da resina. Para a avaliação da resistência à tração, os espécimes foram primeiramente condicionados e restaurados com os sistemas adesivos autocondicionantes. Em um segundo grupo, os espécimes foram condicionados e restaurados com os sistemas adesivos autocondicionantes, lavados e restaurados com um sistema adesivo controle seguidos da aplicação da resina. Foram seccionados em fatias de seção transversal uniforme e testados até sua fratura. Os padrões de condicionamento do esmalte aprismático e a morfologia da camada híbrida subsuperficial variaram de acordo com a agressividade dos adesivos autocondicionantes. O sistema adesivo autocondicionante de 1 passo produziu condicionamento da superfície semelhante ao encontrado no sistema de condicionamento total. A eficiência de ambos os tipos de condicionamento e

resistência das resinas são fatores de contribuição importantes na adesão de adesivos autocondicionantes ao esmalte.

Naughton & Latta (2005) determinaram a resistência ao cisalhamento à dentina de cinco sistemas adesivos autocondicionantes. Foram utilizados 100 molares humanos polidos com lixa de granulação 600 até expor a dentina. Após a aplicação dos sistemas adesivos, foi aplicada a resina com auxílio de uma matriz. Dez espécimes de cada grupo (n=20) foram armazenados a 37°C e 10 foram armazenados por 30 dias, seguido de 850 ciclos de termociclagem (banhos de 5° - 55°C) com tempo de 1 minuto de duração cada banho. Ambos os sistemas adesivos e o tempo de armazenamento foram fatores significantes afetando a resistência ao cisalhamento. O armazenamento em água e a termociclagem não alterou a resistência de união dos materiais testados de modo significativo.

Kormaz & Attar (2007) investigaram o efeito do uso do LED e do LCUs comparados com a lâmpada halógena na resistência ao cisalhamento de um compósito nanoparticulado e um microhíbrido com adesivos autocondicionantes. Foram utilizadas superfícies vestibulares de molares que foram lixados até expor a dentina e polidos com lixa de granulação 600 com água. Os espécimes foram divididos em 6 grupos (n=10) e submetidos a 500 ciclos de termociclagem (5° - 55°C) e o teste de resistência mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O LED pode ser comparado à luz halógena para resinas nanoparticuladas e microhíbridas com adesivo autocondicionante em dentina.

Reis et al. (2007) avaliaram a habilidade de sistemas adesivos convencionais e autocondicionantes na prevenção de nanoinfiltração induzida pelo tempo e água em interfaces resinosas após 6 meses de armazenamento. Cinco

marcas comerciais de sistemas adesivos foram utilizadas (três diferentes técnicas de adesão aos tecidos dentais duros). Os dentes restaurados foram seccionados em fatias de 0,9mm e armazenados em água ou óleo mineral por 24 horas, 3 e 6 meses. Foi utilizada uma solução reveladora capaz de identificar espaços de tamanho nanométrico preenchidos por água e mudanças ocorridas ao longo do tempo. A análise através da microscopia eletrônica de transmissão revelou que os adesivos autocondicionantes de dois passos mostraram ter acumulado pequena quantidade de prata e os sistemas adesivos convencionais mostraram pequenos depósitos de prata predominantemente dentro da camada híbrida no período de 6 meses. O sistema autocondicionante de passo apresentou acúmulo maciço de prata dentro da camada híbrida e árvores de água dentro da camada adesiva. Após o armazenamento em óleo, depósitos de prata reduzidos foram observados nas interfaces adesivas de todos os grupos. O sistema adesivo autocondicionante de 2 passos, especialmente os que contêm flúor e agente antimicrobiano mostraram a menor nanoinfiltração após 6 meses de armazenamento.

Rotta et al. (2007) examinaram a eficácia do condicionamento de 3 sistemas adesivos autocondicionantes ao esmalte não condicionado e ao condicionado com ácido fosfórico através da microscopia eletrônica de varredura e investigaram a resistência à microtração. Foi utilizado um sistema adesivo convencional como grupo controle. As faces vestibulares e linguais do esmalte de 30 molares foram utilizadas. Após a aplicação dos sistemas adesivos de acordo com o fabricante, os espécimes foram restaurados com resina Z250 e seccionados em fatias de 0,8mm² e testados até a fratura. Todos os sistemas autocondicionantes apresentaram valores mais baixos do que os outros grupos. Os valores de

resistência de união dos sistemas adesivos autocondicionantes com pH mais baixo podem ser empregados com o uso conjunto de ácido fosfórico e com a resina.

Yu et al. (2007) analisaram a resistência à microtração de um adesivo autocondicionante de passo único à dentina *in vitro*. Foram utilizados três sistemas adesivos autocondicionantes de um passo comercialmente disponíveis e um sistema adesivo autocondicionante de dois passos. Os resultados do teste de microtração demonstraram que o sistema autocondicionante de dois passos apresentou valores mais altos o de um passo, embora nenhum deles tenha sido capaz de satisfazer os requisitos clínicos.

2.3 Monômero antibacteriano (MDPB)

Imazato et al. (1998) investigaram o efeito antibacteriano de um primer contendo MDPB após a polimerização. O efeito inibitório do primer polimerizado contendo MDPB no crescimento de três espécies bacterianas através do método de difusão em discos de ágar foi estudado. A atividade bactericida do primer polimerizado foi avaliada pelo contato do material por uma hora com *Streptococcus mutans* e a liberação do MDPB não polimerizado foi medida através de um líquido cromatográfico de alta performance. Os resultados mostraram que o primer polimerizado contendo MDPB mostrou efeito inibitório no crescimento de todas as espécies que estiveram em contato com a superfície do espécime, e exibiram um pequeno efeito no *Streptococcus mutans* sem a liberação de nenhum componente antibacteriano não polimerizado.

Imazato et al. (2003) investigaram a atividade antibacteriana de um adesivo resinoso com monômero antibacteriano (MDPB) incorporado e suas

características relacionadas à resistência de união à dentina e sua habilidade de polimerização. Foi utilizado um adesivo experimental com 2,5% de MDPB (LB Bond), e seu efeito inibitório de espécies contra o crescimento de *Streptococcus mutans* em sua superfície foi testado. A resistência de união à dentina e o grau de conversão dos adesivos experimentais em combinação com 1, 2 e 5% de MDPB presente nos primers que foram previamente relatado por possuir efeito antibacteriano. Os resultados mostraram que o adesivo experimental polimerizado exibiu efeito inibitório contra o crescimento de *Streptococcus mutans*, reduzindo o número de bactérias em aproximadamente 3% do que o adesivo controle sem MDPB. A resistência à tração do adesivo experimental não foi significativamente diferente do controle, e o uso em combinação com o primer contendo MDPB não mostrou nenhuma interferência adversa na resistência de união. O grau de conversão do sistema adesivo não foi diferente entre o controle e o adesivo experimental. O adesivo resinoso com a atividade antibacteriana após a polimerização pode ser produzido pela incorporação do MDPB sem influenciar a resistência de união e a polimerização, seguindo que ele pode ser altamente efetivo antes e depois da polimerização.

Imazato et al. (2006) investigaram os efeitos antibacterianos do primer dentinário de um sistema adesivo autocondicionante comercialmente disponível contendo monômero antibacteriano. Através do método de difusão em discos de ágar, os efeitos inibitórios contra 3 espécies bacterianas foram examinados utilizando o sistema adesivo Clearfil Protect Bond (primer com 5% MDPB) e um monômero ácido promotor de adesão (MDP), um primer contendo somente MDPB e um primer com 1% de cloreto de cetilpiridínio. A concentração inibitória/bactericida mínima de cada primer para as três espécies foi determinada por uma série de microdiluições. Para testar os efeitos bactericidas observados em dentina, o primer

foi aplicado a blocos de dentina desmineralizados onde o *Streptococcus mutans* foi empregado e o número de bactérias viáveis foi contado. Os resultados demonstraram que para as três espécies bacterianas o tamanho das zonas de inibição produzidas pelo sistema adesivo em estudo, foi significativamente maiores dos que os outros primers e as concentrações mínimas foram menores. Nenhuma das bactérias se restabeleceu após a aplicação do primer com MDPB 5% à dentina impregnada com bactérias, apesar do primer sem MDPB demonstrar o mesmo efeito bactericida.

Imazato et al. (2007) examinaram *in vivo* a habilidade adesiva de sistemas adesivos incorporados com monômero antibacteriano (MDPB) à dentina sadia. Foram confeccionados preparos classe V na face vestibular dos dentes caninos que foram restaurados com diferentes marcas comerciais. Após 7 dias, as coroas dentais foram cortadas e fixadas em solução de Karnovsky e a superfície seccionada foi observada em microscopia eletrônica de varredura (SEM) após tratamento com ácido fosfórico e hipoclorito de sódio. A interface adesiva foi observada através do microscópio eletrônico de transmissão (TEM). A resistência à microtração de cada grupo foi verificada utilizando dentes extraídos. SEM demonstrou que todos os grupos produziram camadas híbridas com espessura de 1-2 μm com tags resinosos em forma de funil, apesar do comprometimento dos tags serem mais curtos para o grupo contendo MDPB. TEM confirmou a boa adesão do sistema adesivo com MDPB, mostrando haver integridade entre a resina e o dente. Os materiais contendo MDPB produziram adesão efetiva sob condições *in vivo*.

2.4 Biofilme

Geddes et al. (1978) observaram que mudanças ópticas no esmalte são semelhantes a lesões de cárie iniciais quando os voluntários não higienizaram por 14 dias e enxaguavam a boca 9 vezes ao dia com solução de sacarose; o grupo controle que não utilizou a solução de sacarose para bochecho mostrou significativamente menos mudanças no esmalte.

Pratten & Wilson (1999) avaliaram os efeitos da aplicação repetida de gluconato de clorexidine sobre a viabilidade e composição bacteriana do microcosmo da placa dental derivado da saliva humana. O biofilme foi formado sobre discos de esmalte bovino com uma película fermentadora de espessura constante e mantidos em saliva artificial com suplementação de sacarose 3 vezes ao dia. O microcosmo da placa apresentou contagens viáveis de anaeróbios que consistiam de *Actinomyces* spp, *Streptococci* e *Veillonella* spp. Quando a clorexidine 0,2% foi borrifada, a contagem de anaeróbios viáveis foi imediatamente reduzida. Apesar da clorexidine 0,2% ter continuado, as contagens viáveis se restabeleceram. A dupla-aplicação de borrifos de clorexidine 0,2% após quatro dias foi inefetiva na redução das contagens de anaeróbios totais no biofilme, mas não alteraram a composição bacteriana.

Pratten et al. (2000) investigaram a estrutura do biofilme oral intacto através da microscopia confocal de varredura a laser. Biofilmes com espécies variadas foram cultivados sobre discos de esmalte em uma película fermentadora de espessura constante. Os biofilmes foram mantidos em saliva artificial contendo saliva e sem suplementação de sacarose e depois foram examinados. A microestrutura do biofilme não suplementado se revelou complexa, com aglomerados bacterianos, enquanto que, o biofilme suplementado pareceram

colonizar o substrato mais rapidamente. Os resultados demonstraram que através do uso da microscopia confocal de varredura a laser é possível analisar a estrutura dos biofilmes orais formados em condições similares às existentes *in vivo*.

Hodgson et al. (2001) analisaram *in vitro* as respostas fisiológicas e ecológicas ao desafio cariogênico em populações bacterianas e subseqüentes alterações na mineralização do esmalte. Sete diferentes colônias bacterianas foram formadas em um biofilme na superfície do esmalte e hidroxiapatita em um sistema de cultura contínua e expostas a desafios contínuos com sacarose. As colônias presentes sobre a superfície da hidroxiapatita foram enumeradas. Foram realizadas microradiografias no esmalte seccionado e observou-se o aumento da desmineralização com o aumento da concentração da sacarose. As lesões formadas eram semelhantes às manchas brancas encontradas *in vivo*. Conclui-se que o modelo *in vitro* tem sido válido para a análise de ambas as respostas fisiológicas e ecológicas frente aos desafios cariogênicos com relação às populações bacterianas e as mudanças na mineralização do esmalte.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar *in situ* o efeito anticariogênico de sistemas adesivos contendo flúor e MDPB na interface restauradora (esmalte-dentina/ restauração) através de testes de microdureza.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental - as unidades experimentais foram 120 fragmentos dentais distribuídos aleatoriamente entre os seis grupos. Os fatores em estudo nesse experimento foram:

a) agentes de tratamento (tabela 1):

- Optibond FL (Kerr Corp., CA, USA) - OPFL;
- Adper Single Bond 2 (3M ESPE, CA, USA) - APSB;
- Prime & Bond 2.1 (DENTSPLY De Trey GmbH, Konstanz, Germany) - PRBO;
- Optibond Solo Plus (Kerr Corporation, CA, USA) - OPSP;
- Adper Prompt (3M ESPE, Seefeld, Germany) - ADPR;
- Clearfil Protect Bond (Kuraray Co., Ltd., Kurashiki, Japan) – CLPB;

b) profundidades das indentações no teste de microdureza:

- 20 μ da margem oclusal da restauração;
- 40 μ da margem oclusal da restauração;
- 60 μ da margem oclusal da restauração;

c) distâncias das indentações no teste de microdureza:

- 100 μ da interface adesiva;
- 200 μ da interface adesiva;
- 300 μ da interface adesiva;

Cada dispositivo palatino em acrílico recebeu seis fragmentos que receberam previamente a aplicação de cada um dos diferentes tipos de sistemas adesivos. Os vinte voluntários selecionados foram caracterizados como um bloco completo.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia e Centro de Pós-Graduação São Leopoldo Mandic, Campinas, SP, Brasil (Processo número 06/161).

Tabela 1 - Materiais, composição, número de lote e fabricantes.

Material	Lote	Composição	Fabricantes
Adesivo convencional de 3 passos	Optibond FL (primer: 452271, adesivo: 2715843)	Primer: MDP, MDPB, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, água Adesivo: MDP, bis-GMA, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, DL-canforoquinona, Trifluoreto de Itérbio	Kerr Corporation, Orange, California, United States
Adesivo convencional de 2 passos	Adper Single Bond 2 (6JA)	Etanol, água, bis-GMA, HEMA, dimetacrilatos, sistema fotoiniciador, metacrilato funcional, copolímero dos ácidos poliacrílico e politacônico	3M ESPE, Irvine, California, United States
Adesivo convencional de 2 passos	Prime & Bond 2.1 (734289)	PENTA, resina de dimetacrilato, acetona, fluoreto de cetilamina	DENTSPLY De Trey GmbH, Konstanz, Germany
Adesivo convencional de 2 passos	Optibond Solo Plus (443121)	bis-GMA, HEMA, GPDM, fluorsilicato de sódio, fotoiniciador	Kerr Corporation, Orange, California, United States
Adesivo autocondicionante de 1 passo	Adper Prompt (A - 242920, B - 250246)	Éster fósfórico metacrilato, estabilizadores, parabeno, complexos de flúor, iniciadores	3M ESPE, Seefeld, Germany
Adesivo autocondicionante de 2 passos	Clearfil Protect Bond (41137)	Primer: MDP, MDPB, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, água Adesivo: MDP, bis-GMA, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, DL-canforoquinona, <i>N</i> -dietanol <i>p</i> -toluidina, sílica coloidal silanizada, fluoreto de sódio	Kuraray Medical Co., Ltd., Kurashiki, Okayama, Japan

(MDP, 10-metacrilóiloxidodecil dihidrogênio fosfato; MDPB, 12-metacrilóiloxidodecil piridínio bromato; HEMA, 2-hidroxiethyl metacrilato; bis-GMA, bisfenol-glicidil-dimetacrilato; PENTA, dipentaeritritol-pentacrilato ester fosfato; GPDM, glicerofosfato dimetacrilato).

Seleção dos voluntários e preparo para utilização do dispositivo

Os participantes do experimento se apresentavam na faixa etária entre 18 e 30 anos. Deveriam ser livres de lesões de cárie ativa (o risco de cárie foi avaliado através de exame clínico), baixo risco de desenvolvimento de cárie ou doença periodontal, não usuários de aparelho ortodôntico ou próteses removíveis. Os voluntários selecionados receberam um tubo de dentifrício sem flúor (Farmácia UNIARARAS, Araras, SP, Brasil) e uma escova dental (Bitufo 28 Extra Macia - Bitufo Mont. e Com. de Escovas Ltda, Itupeva, SP, Brasil) e foram instruídos a utilizá-los por uma semana antes da instalação dos dispositivos (esse período foi chamado de caracterizando *Lead-in* - promover padronização das condições bucais no início do experimento para minimizar variações (McComb D, 1996) e limitar o contato dos participantes da pesquisa com o flúor).

Preparo das cavidades e restaurações

Sessenta terceiros molares humanos totalmente inclusos extraídos por motivos não relacionados aos da pesquisa, foram mantidos em timol 0,1% e pH 7,0 após sua extração, foram utilizados nesse experimento. Os dentes foram submetidos ao debridamento com lâminas de bisturi e curetas periodontais.

A porção cervical das faces vestibular e palatal/ lingual foram utilizadas. Preparos cavitários classe V foram confeccionadas com broca cilíndrica topo plano com stop nº2292 (KG Sorensen Ind. e Com. Ltda, Barueri, SP, Brasil) em alta rotação e refrigeração com spray de água destilada em ambas as faces dentais. A região oclusal do preparo foi localizada com margens em esmalte e a região cervical foi localizada em dentina. A fim de manter a uniformidade dos preparos, as brocas

foram trocadas a cada dez cavidades preparadas. Cento e vinte preparos dentais foram selecionados, que se apresentavam centralizados nas faces vestibular e palatal/lingual e com paredes paralelas entre si. Os dentes contendo os preparos foram reduzidos até medirem 4 mm x 4 mm e 2 mm de espessura. Em seguida, os tratamentos foram aplicados aleatoriamente (n=20):

Optibond FL (OPFL) - aplicação do ácido fosfórico 37% por 15 segundos, lavagem por 15 segundos, secagem suave com papel absorvente mantendo a dentina úmida, aplicação passiva do primer por 15 segundos, evaporação do solvente com suave com jato de ar por 5 segundos, aplicação do adesivo e fotopolimerização por 20 segundos.

Adper Single Bond 2 (ADSB) - aplicação do ácido fosfórico 37% por 15 segundos, lavagem por 15 segundos, secagem suave com papel absorvente mantendo a dentina úmida, aplicação de duas camadas consecutivas do adesivo sob gentil agitação e aguardar 15 segundos, evaporação do solvente com suave com jato de ar e fotopolimerização por 10 segundos.

Prime & Bond 2.1 (PRBO) - aplicação do ácido fosfórico 37% por 15 segundos, lavagem por 15 segundos, secagem suave com algodão hidrofílico mantendo a dentina úmida, aplicação do adesivo e aguardar 20 segundos, evaporação do solvente com breve jato de ar por 5 segundos e fotopolimerização por 10 segundos. Aplicação da segunda camada, evaporação do solvente com suave jato de ar e aplicação da resina composta imediatamente.

Optibond Solo Plus (OPSP) - aplicação do ácido fosfórico 37% por 15 segundos, lavagem por 15 segundos, secagem suave com papel absorvente mantendo a dentina úmida, aplicação ativa do adesivo e fotopolimerização por 10 segundos.

Adper Prompt (ADPR) - aplicação ativa do adesivo por 15 segundos, evaporação do solvente com ar e fotopolimerização por 10 segundos.

Clearfil Protect Bond (CLPB) - aplicação do primer autocondicionante por 20 segundos, secagem por 20 segundos, aplicação do adesivo e fotopolimerização por 10 segundos.

Após aplicação dos sistemas adesivos, foi utilizada uma resina composta nanoparticulada (3M ESPE, Seefeld, Germany) com técnica de inserção incremental (2 camadas oblíquas) e polimerização por 20 segundos cada. O fotopolimerizador utilizado (lâmpada halógena) (Optilight Plus, Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com potência média de intensidade de luz de 440 mW/cm^2 (412 mW/cm^2 a 520 mW/cm^2) aferida com radiômetro (Newdent Equipamentos LTDA, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

O dente foi reduzido ao tamanho de um fragmento contendo a restauração com dimensões de 4 mm x 4 mm e 2 mm de espessura. Para a verificação das medidas foi utilizado um paquímetro digital (Mitutoyo Corporation, Japão). Os fragmentos foram esterilizados em autoclave (1 atm de pressão - 121°C por 20 minutos) para certificar a ausência de qualquer tipo de microorganismos que pudesse interferir nos resultados e impedir a contaminação dos voluntários.

Dispositivos removíveis intra-bucais

Os voluntários foram moldados com alginato para a confecção do dispositivo intra-bucal palatino (Benelli et al., 1993) em resina acrílica (Jet/Artigos Odontológicos Clássico, SP, Brasil).

Seis espaços com dimensões de aproximadamente 5 mm x 5 mm foram deixados na porção palatal do dispositivo para posterior encaixe dos fragmentos

dentais restaurados. A fixação dos fragmentos foi feita com resina composta (3M ESPE, Seefeld, Germany) aplicada nas faces laterais e sob a base do fragmento. Uma tela plástica foi posicionada sobre os fragmentos para facilitar a retenção de biofilme bacteriano, como mostra a figura 1.

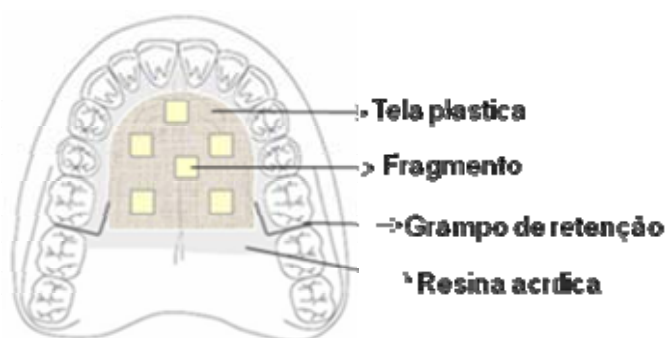


Figura 1 - Dispositivo intra-bucal utilizado pelos voluntários.

Para a realização da fase *in situ* do experimento, os voluntários receberam além da escova dental e um tubo de dentifrício sem flúor entregues previamente, o dispositivo palatino e um recipiente plástico para seu armazenamento (somente durante as refeições), um vidro de 100 ml de solução de sacarose 20% (Farmácia UNIARARAS, Araras, SP, Brasil) (Benelli et al., 1993) com conta-gotas (oito vezes ao dia, com intervalo de 2 horas, durante o período de 21 dias) e as instruções de procedimentos durante a condução do experimento. Os voluntários foram semanalmente observados para acompanhamento e avaliação.

Ensaio de microdureza

Após o uso dos dispositivos por 21 dias, os fragmentos foram removidos dos aparelhos, e seccionados longitudinalmente através do centro da restauração

em cortadeira metalográfica (IsoMet 1000 Precision Saw, Buehler, United States). Os fragmentos cortados foram embutidos em resina de poliéster (Massa Fix - Royal Polimeros Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda, SP, Brasil).

Para se obter superfícies polidas para os ensaios de microdureza, foram utilizadas lixas de papel impregnadas com óxido de alumínio de granulação 1200 (3M do Brasil - Sumaré, SP, Brazil), em politriz elétrica rotativa (Aropol 2V - Arotec S/A Ind. Com., SP, Brasil) refrigerada com água, a uma velocidade de 600 r.p.m.. As lixas de papel foram trocadas a cada cinco corpos-de-prova.

O ensaio de microdureza foi realizado para avaliar a presença de desmineralização ao redor das restaurações de resina. Nove medições foram feitas em cada fragmento em esmalte e nove medidas em dentina (18 indentações por corpo-de-prova). As indentações foram realizadas na margem oclusal de cada restauração, com distâncias padronizadas para todas as restaurações avaliadas (100, 200 e 300 μm de distância da margem oclusal da restauração e a 20, 40 e 60 μm de uma profundidade do ângulo cavo-superficial em direção ao limite amelo-dentinário) (figura 2).

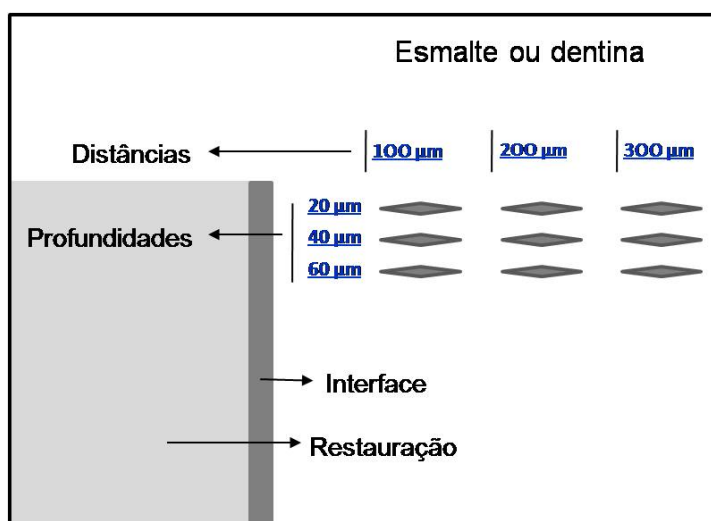


Figura 2 - Indentações de microdureza (distâncias e profundidades).

A análise de microdureza foi efetuada utilizando um microdurômetro e o penetrador tipo Knoop (Digital microhardness tester HVS 1000, PanTec, SP, Brasil), com carga estática de 10 gf e duração de aplicação de cinco segundos.

Análise dos dados

Análise de variância (ANOVA) dois critérios em um desing split-plot com nível de significância de 5% .

5 RESULTADOS

A Análise de Variância mostrou que, para esmalte, houve diferença significativa entre os sistemas adesivos ($p=0,0106$) e a interação sistema adesivo*distância foi significativa ($p=0,0006$). Não houve diferença significativa entre as profundidades ($p=0,3372$), entre sistemas adesivos*profundidades ($p=0,3306$), entre as distâncias ($p=0,5146$) e nem entre sistemas adesivos*distância*profundidade ($p=0,6730$) (tabela 2).

Tabela 2 - Microdureza no esmalte em função do grupo, da profundidade e da distância.

PROFUNDIDADE																		
DISTÂNCIA	20						40						60					
	100		200		300		100		200		300		100		200		300	
GRUPO	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP
OPFL	73,2 a	54,2	71,8 ab	55,2	68,1 ab	50,0	78,6 a	67,9	72,4 ab	46,3	68,4 ab	47,2	81,1 a	70,1	71,4 ab	54,6	73,4 ab	51,6
APSB	53,1 a	27,7	64,3 ab	36,2	57,2 b	27,7	59,6 a	26,4	55,7 ab	25,2	54,3 b	26,7	55,8 a	24,5	64,1 ab	43,6	58,7 ab	44,9
PRBO	46,2 a	22,4	49,0 b	28,7	47,3 b	26,6	53,9 a	26,0	50,2 b	26,9	47,2 b	27,2	66,2 a	39,3	51,8 b	24,8	47,3 b	28,9
OPSP	56,7 a	33,3	54,9 ab	21,6	58,9 ab	31,4	53,2 a	27,4	54,4 b	23,7	49,6 b	21,5	57,1 a	25,9	52,5 b	25,6	50,4 b	20,6
ADPR	75,4 a	45,2	92,9 a	63,8	107,7 a	101,3	77,8 a	39,5	89,2 a	51,1	102,5 a	72,9	68,5 a	36,8	90,3 a	53,4	99,5 a	67,6
CLPB	51,0 a	24,9	56,7 ab	25,2	50,8 b	25,7	53,8 a	28,2	54,5 b	24,3	61,1 b	31,0	60,0 a	31,7	53,2 b	26,0	67,0 ab	31,7

Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal dentro de cada distância) diferem entre si pela ANOVA, $p \leq 0,05$.

De maneira geral, a tabela 1 mostra que o esmalte adjacente ao sistema adesivo Adper Prompt apresentou os maiores valores de microdureza seguido pelos sistemas adesivos Optibond FL e Adper Single Bond 2, Clearfil Protect Bond, Optibond Solo Plus, Prime & Bond 2.1.

Para dentina, verificou-se que não houve diferença significativa entre os sistemas adesivos ($p=0,3308$) nem entre as distâncias ($p=0,1456$), mas houve

diferença significativa entre as profundidades ($p=0,0052$) (tabela 3), observando-se que a média dos valores de microdureza na profundidade 20 μm não diferiu estatisticamente das profundidades 40 μm e 60 μm .

Tabela 3 - Microdureza na dentina em função do grupo, da profundidade e da distância.

DISTÂNCIAS																		
100							200						300					
DISTÂNCIA	20		40		60		20		40		60		20		40		60	
GRUPO	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP
OPFL	32,1	18,4	33,7	26,2	33,5	23,1	33,6	16,6	35,7	24,0	37,2	23,1	34,7	18,8	36,3	24,3	40,9	29,1
APSB	26,4	21,5	22,1	18,0	25,5	25,1	29,5	26,5	25,5	25,9	32,7	27,9	25,1	26,4	24,3	25,4	24,8	26,7
PRBO	30,7	17,1	32,3	19,8	34,2	22,3	33,1	23,6	27,6	17,5	30,8	22,9	29,2	22,0	28,7	21,6	33,8	23,9
OPSP	23,8	12,5	24,6	16,5	24,9	14,1	29,4	23,0	29,0	22,1	32,6	21,6	33,7	22,9	29,6	18,0	26,7	15,6
ADPR	38,8	24,7	40,9	28,2	42,7	34,1	37,4	27,2	36,6	24,6	42,4	32,2	42,6	33,6	43,0	34,6	43,8	33,3
CLPB	39,2	27,2	35,1	24,8	37,8	24,9	39,2	27,5	34,5	21,9	38,4	27,8	39,1	30,1	38,7	27,4	36,7	26,2
Tukey	AB		B		A		AB		B		A		AB		B		A	

Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal dentro de cada distância) diferem entre si pela ANOVA, $p \leq 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Os sistemas adesivos foram desenvolvidos para permitir o selamento entre a restauração e o substrato dental (Cal et al., 2006). Entretanto, se a adesão falhar, há a possibilidade de ocorrer microinfiltração (passagem de bactérias, fluídos, substâncias químicas, moléculas e íons entre o dente e a restauração), que pode prejudicar a longevidade da restauração, contribuindo com o surgimento de manchamento, cárie recorrente e resposta pulpar adversa, além de sensibilidade pós-operatória (Bergenholtz et al., 1982). Deve-se considerar que os compósitos restauradores apresentam coeficiente de expansão térmico-linear diferente do esmalte e da dentina, levando à presença de gaps entre o dente e a restauração, assim como, microinfiltração (Perdigão et al., 1996). Além disso, microrganismos ativos podem ser inadvertidamente deixados para trás pela incompleta remoção da cárie (Imazato et al., 2007). Por esse motivo, a atividade antibacteriana é uma propriedade importante dos sistemas adesivos para o sucesso da restauração (Imazato et al., 1998), podendo-se incluir a presença e liberação de fluoretos que apresenta um papel significativo na inibição do processo de desmineralização adjacente à cavidade restaurada, resultando na estabilidade da interface adesiva (Nakajima et al., 2003) por meio da redução da solubilidade de fosfato de cálcio presente na camada híbrida (ten Cate, van Duinen, 1995). Em casos em que o paciente apresenta alto risco de desenvolver lesões de cárie, a utilização de materiais restauradores que liberam flúor e/ou que contenham MDPB podem substancialmente contribuir com a prevenção/ paralisação da lesão (ten Cate, van Duinen, 1995).

A adição de componentes extras no sistema adesivo, como agentes antimicrobianos não-polimerizados, pode freqüentemente interromper a forma física do polímero, levando a redução de suas propriedades físicas (Addy, Handley, 1981). Dentre estes componentes extras antibacterianos, o monômero polimerizável MDPB é sintetizado pela combinação entre um agente antibacteriano e um grupo metacrilóil e não afeta a polimerização do primer e a adesão da resina (Imazato et al., 2003) que poderia resultar em um aumento significativo da estabilidade hidrolítica da interface adesiva (Imazato et al., 2007). Entretanto, a incorporação do MDPB aumenta a capacidade hidrofóbica dos adesivos e o flúor previne a degradação da dentina (reduz a solubilidade do fosfato de cálcio presente na camada híbrida estabilizando a resistência de união à dentina) o que resulta na estabilidade da interface adesiva (Imazato et al., 2003). Esse monômero é co-polimerizado com outros monômeros e o agente antibacteriano é imobilizado na matriz polimérica dos materiais resinosos (primer e adesivo) depois da polimerização. O agente imobilizado não é liberado do material, mas atua como inibidor contra as bactérias que atacam a superfície através do contato (bacteriostático) (Imazato, 2003). Materiais com capacidade antibacteriana mostram efeitos inativadores somente contra as bactérias que entram em contato com as moléculas antibacterianas imobilizadas. Contudo, embora o MDPB não polimerizado mostre atividade antibacteriana (Imazato et al., 1994), o primer contendo o MDPB polimerizado não produziu zonas de inibição (ten Cate, van Duinen, 1995) provavelmente porque o efeito inativador não é capaz de alcançar a área ao redor dos materiais restauradores (Imazato, 2003), corroborando com os resultados desse estudo, que mostrou que o sistema adesivo Clearfil Protect Bond não foi capaz de impedir ou mesmo reduzir a severidade das lesões de cárie secundária. Entretanto, de acordo

com Reis et al. (2007), o sistema adesivo autocondicionante de dois passos contendo flúor e MDPB demonstrou ser o mais efetivo na prevenção de nanoinfiltração após um período de seis meses de armazenamento comparado com outros sistemas adesivos contendo flúor (Reis et al., 2007).

Apesar de o MDPB apresentar excelente propriedade antibacteriana *in vitro*, a formação da película bacteriana sobre os materiais restauradores pode ocorrer *in vivo* e a absorção de proteínas pode afetar a atividade antibacteriana do MDPB, o que justifica a necessidade de investigação da atividade antibacteriana na presença de saliva e placa (Imazato et al., 1994). Neste estudo, uma situação de alto desafio cariogênico foi simulada, em que o uso da sacarose foi adicionado para produzir um biofilme mais denso (Pratten et al., 2000; Hodgson et al., 2002). A sacarose pode afetar a composição bacteriana do biofilme e isso tem sido mostrado com o aumento da colonização das superfícies pela espécie *Streptococcus* no biofilme derivado da saliva humana natural (McComb, 1996). A saliva suplementada com sacarose sofre rápida redução do pH, similar a observada *in vivo* após desafio com carboidratos, o que estimula o crescimento de bactérias acidúricas. Na presença de freqüente exposição à sacarose, lesões iniciais de cárie são clinicamente detectadas depois de 14-21 dias (Geddes et al., 1978). Existem alguns estudos demonstrando que o sistema adesivo Clearfil Protect Bond é efetivo na inibição da invasão bacteriana através dos gaps na interface adesiva após a inserção da restauração, levando a inibição de cárie secundária (Imazato et al., 2006), bem como inibindo a invasão bacteriana na interface dente-resina depois da inserção da restauração, tanto de *Streptococcus*, como *Lactobacillus*, bastonetes de bactérias Gram-positivas e bactérias anaeróbias obrigatórias são encontrados de

acordo com os resultados obtidos, este sistema adesivo não conseguiu minimizar a perda mineral em esmalte e dentina.

Por outro lado, adesivos contendo flúor foram desenvolvidos com o objetivo de inibir cárie secundária. É desejável que os adesivos dentinários que contenham flúor o liberem em direção à margem da restauração como efeito benéfico para o esmalte e dentina desmineralizados (Imazato et al., 2003). Embora a camada híbrida seja ácido-resistente, não é capaz de aumentar a resistência da dentina cavitária e inibir a formação de lesões de cárie secundária ao longo das paredes cavitárias. Uma alta concentração de flúor ao redor da restauração deve ser necessária para inibir as lesões de parede (Itota et al., 2002). Para que a liberação de flúor dos materiais ocorra, inicialmente a água que se infiltra e difunde deve passar pela camada do adesivo na superfície (Korkmaz, Attar, 2007). Os solventes acetona e etanol são substâncias voláteis que podem facilmente evaporar dos espécimes durante e depois da polimerização. Depois da evaporação do solvente, os sistemas adesivos apresentam estrutura porosa que é capaz de elevar a absorção de água (Itota et al., 2005). Dentre os sistemas adesivos avaliados contendo flúor, o sistema adesivo Adper Prompt foi o que demonstrou o melhor efeito anticariogênico em esmalte, apesar de apresentar baixa resistência adesiva como demonstrado em alguns trabalhos (Naughton, Latta, 2005; Korkmaz, Attar, 2007; Rotta et al., 2007; Yu et al., 2007). Esse tipo de sistema apresenta água em sua composição, que é fundamental para deflagrar a reação de acidificação e desmineralização dos substratos dentinários quando o material é aplicado. Com base nesta afirmativa, sugere-se que os compostos fluoretados utilizem a água como meio de dissolução e transporte dos íons fluoreto através dos tecidos, o que

poderia explicar o bom desempenho desse material diante dos outros sistemas avaliados.

O sistema adesivo Adper Single Bond 2, controle negativo, por não apresentar nenhum tipo de agente antimicrobiano como os outros sistemas adesivos avaliados. Entretanto, mostrou comportamento similar aos outros sistemas adesivos que contém agentes antimicrobianos, o que mostra que o flúor ou o MDPB parecem não apresentar efetividade nos sistemas Prime & Bond 2.1, Optibond Solo Plus e Clearfil™ Protect Bond e, como consequência, não são capazes de inibir o aparecimento de lesões na interface em esmalte.

Portanto, para esmalte é importante determinar qual sistema adesivo será utilizado. O sistema adesivo que apresentou os melhores resultados é o autocondicionante de 1 passo e, provavelmente por ser bastante ácido, é capaz de produzir interfaces adesivas morfolologicamente semelhantes às aquelas produzidas pelos adesivos convencionais, tanto em esmalte quanto em dentina (Tay, Pashley, 2001; Pashley, Tay, 2001). Os sistemas adesivos convencionais (3 e 2 passos) apresentam melhor performance, seguidos pelos autocondicionantes de 2 passos. O sistema adesivo autocondicionante de 1 passo conseguiu minimizar a perda mineral do esmalte frente ao desafio cariogênico *in situ*, embora não tenha demonstrado capacidade de inibir a formação de lesões de cárie secundária.

Para dentina, alguns dos estudos encontrados tem se mostrado a efetividade dos sistemas adesivos que contém em sua composição o flúor e o MDPB, os resultados obtidos neste experimento mostraram que nenhum dos sistemas adesivos avaliados foi efetivo em minimizar a severidade das lesões de cárie secundária. Portanto, pode-se sugerir que não há um sistema adesivo ideal que iniba as lesões de cárie secundária. As diferentes características morfológicas e

funcionais entre o esmalte e a dentina desempenham um papel fundamental na eficiência clínica dos adesivos, a dentina apresenta valores de resistência adesiva baixos (Pashley, Tay, 2001). A dentina é um substrato naturalmente úmido e que requer uma técnica úmida de adesão; entretanto, essa abordagem compromete de maneira significativa a qualidade e a durabilidade da adesão. Os sistemas adesivos convencionais de 1 passo são compatíveis com o substrato úmido devido à mistura dos componentes do primer hidrofílico com os monômeros resinosos hidrofóbicos do adesivo, enquanto que, para os sistemas autocondicionantes a umidade não representa ser um fator relevante para o desempenho desses sistemas (Pashley, Tay, 2001). Portanto, a escolha de um sistema adesivo adequado para a dentina poderia ser relacionado a outras propriedades do material, como altos valores de resistência de união, menor sensibilidade técnica relativa à aplicação e preferência do profissional.

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que para esmalte, o sistema adesivo autocondicionante de 1 passo contendo flúor apresentou melhor efeito anticariogênico em relação às diferentes distâncias e profundidades avaliadas. Entretanto, para dentina, não houve interferência do sistema adesivo utilizado em minimizar a severidade da lesão de cárie secundária.

REFERÊNCIAS¹

- Addy M, Handley R. The effects of the incorporation of chlorhexidine acetate on some physical properties of polymerized and plasticized acrylics. *J Oral Rehabil*. 1981 Mar;8(2):155-63.
- Bapna MS, Murphy R, Mukherjee S. Inhibition of bacterial colonization of antimicrobial agents incorporated into dental resins. *J Oral Rehabil*. 1988 Sep;15(5):405-11.
- Benelli EM, Serra MC, Rodrigues AL Jr, Cury JA. In situ anticariogenic potential of glass ionomer cement. *Caries Res*. 1993;27(4):280-84.
- Bergenholtz G, Cox CF, Loesche WJ, Syed SA. Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp. *J Oral Pathol Med*. 1982 Nov;11(6):439-50.
- Brännström M. The cause of postoperative sensitivity and its prevention. *J Endod*. 1986. Oct;12(10):475-81.
- Cal E, Türkün LS, Türkün M, Toman M, Toksavul S. Effect of an antibacterial adhesive on the strength of three different luting resin composites. *J Dent*. 2006 July;34(6):372-80.
- Doi J, Itota T, Yoshiyama M, Tay FR, Pashley DH. Bonding to root caries by a self-etching adhesive system containing MDPB. *Am J Dent*. 2004 Apr;17(2):89-93.
- Geddes DA, Cooke JA, Edgar WM, Jenkins GN. The effect of frequent sucrose mouth rinsing on the induction in vivo of caries-like changes in human dental enamel. *Arch Oral Biol*. 1978;23(8):663-5.
- Grieve AR, Alani A, Saunders WP. The effects on the dental pulp of a composite resin and two dentine bonding agents and associated bacterial microleakage. *Int Endod J*. 1991 May;24(3):108-18.
- Han L, Edward C, Okamoto A, Iwaku M. A comparative study of fluoride-releasing adhesive resin materials. *Dent Mater J*. 2002 Mar;21(1):9-19.
- Hodgson RJ, Lynch RJ, Watson GK, Labarbe R, Treolar R, Allison C. A continuous culture biofilm model of cariogenic response. *J Appl Microbiol*. 2001 Mar;90(3):440-8.
- Imazato S, Ehara A, Torii M, Ebisu S. Antibacterial activity of dentin primer containing MDPB after curing. *J Dent*. 1998 Mar;26(3):267-71.
- Imazato S, Imai T, Russel RR, Torii M, Ebisu S. Antibacterial activity of cured dental resin incorporating the antibacterial monomer MDPB and an adhesion-promoting monomer. *J Biomed Mater Res*. 1998 Mar;39(4):511-5.

¹ De acordo com o Manual de Normatização para Dissertações e Teses da Faculdade de Odontologia e Centro de Pós-Graduação São Leopoldo Mandic baseado no modelo Vancouver de 1997, e abreviatura dos títulos de periódicos em conformidade com o Index Medicus.

Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S, Tay FR. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. *Dent Mater*. 2003 June;19(4):313-9.

Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Torii M, Russell RR, McCabe JF. Incorporation of antibacterial monomer MDPB in dentin primer. *J Dent Res*. 1997 Mar;76(3):768-72.

Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. *Dent Mater*. 2006 June;22(6):527-32.

Imazato S, Tay FR, Kaneshiro AV, Takahashi Y, Ebisu S. An in vivo evaluation of bonding ability of comprehensive antibacterial adhesive system incorporating MDPB. *Dent Mater*. 2007 Feb;23(2):170-6.

Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF, Russell RR. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J Dent Res*. 1994 Aug;73(8):1437-43.

Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater*. 2003 Sept;19(6):449-57.

Itota T, Nakabo S, Iwai Y, Konishi N, Nagamine M, Torii Y. Inhibition of artificial secondary caries by fluoride-releasing adhesives on root dentin. *J Oral Rehabil*. 2002 June;29(6):523-7.

Itota T, Nakabo S, Narukami T, Tashiro Y, Torii Y, McCabe JF, Yoshiyama M. Effect of two-step adhesive systems on inhibition of secondary caries around fluoride-releasing resin composite restorations in root dentine. *J Dent*. 2005 Feb;33(2):147-54.

Korkmaz Y, Attar N. Dentin bond strength of composites with self-etching adhesives using LED curing lights. *J Contemp Dent Pract*. 2007 July;8(5):34-42.

McComb D. Adhesive luting cements-classes, criteria and usage. *Compend Contin Educ Dent*. 1996 Aug;17(8):759-62.

Mjör IA, Toffenetti F. Secondary caries: a literature review. *Quintessence Int*. 2000 Mar; 31(3):165-79.

Nakajima M, Okuda M, Ogata M, Pereira PNR, Tagami J, Pashley DH. The durability of a fluoride-releasing resin adhesive system to dentin. *Oper Dent*. 2003 Mar-Apr;28(2):186-92.

Naughton WT, Latta MA. Bond strength of composite to dentin using self-etching adhesive systems. *Quintessence Int*. 2005 Apr;36(4):259-62.

Pashley DH, Tay FR. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. Part II: etching effects on unground enamel. *Dent Mater*. 2001 Sept;17(5):430-44.

Perdigão J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Braem M, Yildiz E, Yücel T et al. The interaction of adhesive system with human dentin. *Am J Dent*. 1996 Aug;9(4):167-73.

Pratten J, Andrews CS, Craig DQ, Wilson M. Structural studies of microcosm dental plaques grown under different nutritional conditions. *FEMS Microbiol Lett*. 2000 Aug;189(2):215-8.

Pratten J, Wilson M. Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 July;43(7):1595-9.

Rawls HR. Preventive dental materials: sustained delivery of fluoride and other therapeutic agents. *Adv Dent Res*. 1991 Dec;5:50-5.

Reis AF, Gianinni M, Pereira PN. Long-term TEM analysis of the nanoleakage patterns in resin-dentin interfaces produced by different bonding strategies. *Dent Mater*. 2007 Sept;23(9):1164-72.

Rotta M, Bresciani P, Moura SK, Grande RH, Hilgert LA, Baratieri LN et al. Effects of phosphoric acid pretreatment and substitution of bonding resin on bonding effectiveness of self-etching systems to enamel. *J Adhes Dent*. 2007 Dec;9(6):537-45.

Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater*. 2001 July;17(4):296-308.

ten Cate JM, van Duinen RN. Hypermineralization of dentinal lesions adjacent to glass-ionomer cement restorations. *J Dent Res*. 1995 June;74(6):1266-71.

Walshaw PR, McComb D. SEM evaluation of the resin-dentin interface with proprietary bonding agents in human subjects. *J Dent Res*. 1994 May;73(5):1079-87.

Yu L, Wang XY, Tian FC, Gao XJ. Microtensile bond strengths of one-step self-etching adhesive system. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2007 Apr;42(4):240-1.

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Por este instrumento particular declaro, para efeitos éticos e legais, que eu (nome) _____, (profissão) _____, portador(a) do RG _____, CPF _____, residente e domiciliado(a) _____, Cidade _____, Estado _____, concordo, em absoluta consciência, com os procedimentos a que vou me submeter para a realização da fase experimental da Dissertação de Mestrado do Curso de Dentística do Centro de Pós-Graduação São Leopoldo Mandic, intitulada “Potencial Anticariogênico ‘*in situ*’ de Sistemas Adesivos Contendo Flúor e MDPB na Interface Restauradora”, tendo como responsáveis a Cirurgiã-Dentista Bruna Maria Covre Garcia da Silva e a Profa. Dra. Roberta Tarkany Basting, nos termos abaixo relacionados:

1- Esclareço que recebi todas as informações sobre minha participação neste experimento constantes nas Instruções aos Voluntários que me foi previamente entregue, possuindo plena liberdade de me abster em particular da referida pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo financeiro, hierárquico ou de qualquer natureza;

2- Esclareço também, que fui amplamente informado, sobre os possíveis benefícios e riscos aos quais estou me submetendo durante este experimento, tomando conhecimento de que o meu consentimento não exime a responsabilidade do profissional que está executando a pesquisa; Os benefícios envolvidos estão relacionados ao conhecimento das minhas condições de higiene bucal e risco mínimo devido todas as instruções que recebi quanto à higiene bucal no período de utilização do dispositivo palatino.

3- Todas essas normas estão de acordo a Resolução n.196 de 10 de Outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

4- Durante o desenvolvimento do experimento, a responsável pela assistência aos pacientes será a cirurgiã-dentista Bruna Maria Covre Garcia da Silva.

Telefones para contato: (19) 3542-8476 / (19) 9264-7153

Por estar de pleno acordo com o teor do presente termo, assino abaixo o mesmo.

Campinas, ____ de _____ de 200__.

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

ANEXO B - Instruções aos Voluntários

- 1- Durante uma semana antes do início do experimento, utilize somente uma escova e dentifrício fornecidos pelos pesquisadores. O bochecho com soluções fluoretadas deve ser evitado;
- 2- O dispositivo intra-bucal deverá ser usado no período de três semanas consecutivas durante todo o tempo, inclusive para dormir;
- 3- Durante as refeições o aparelho deverá ser removido e mantido em recipiente apropriado e umedecido com uma gaze;
- 4- Os procedimentos de higiene bucal devem ser mantidos, sem qualquer alteração;
- 5- Higienize a parte interna do aparelho três vezes ao dia, com escova e dentifrícios fornecidos;
- 6- Durante o uso do aparelho, utilize somente escova e dentifrícios fornecidos pelos pesquisadores. O bochecho com soluções fluoretadas deve ser evitado;
- 7- Deverá ser colocada uma gota de solução de sacarose recebida, sobre cada fragmento dental presente no aparelho, oito vezes ao dia, em intervalos de 2 horas;
- 8- Após o gotejamento da solução de sacarose, aguarde 5 minutos e verta o aparelho, para remover o excesso da solução;
- 9- Qualquer desconforto decorrente da utilização do aparelho deverá ser imediatamente comunicado aos pesquisadores, para a solução do problema;
- 10- Sua colaboração é essencial para que a pesquisa transcorra satisfatoriamente;
- 11- Comparecer a Clínica Odontológica de Dentística do Centro de Pesquisa Odontológica São Leopoldo Mandic nas seguintes datas e horários:

Data: ____/____/____ às ____:____ horas

Data: ____/____/____ às ____:____ horas

Data: ____/____/____ às ____:____ horas

12-Anotar os períodos em que o aparelho permanecer fora do ambiente bucal;

Nome do Voluntário: _____ Nº: _____

É de extrema importância que as instruções, datas e horários acima estabelecidos sejam rigorosamente respeitados. Contamos com a sua colaboração!

ANEXO C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Aprovado pelo CEP

Campinas, 20 de Outubro de 2006.

A(o)

C. D. Bruna Maria Covre Garcia da Silva

Curso: Mestrado em Dentística

Prezado(a) Aluno(a):

O projeto de sua autoria "AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTICARIOGÊNICO IN SITU DE SISTEMAS ADESIVOS CONTENDO FLÚOR E MDPB".

Orientado pelo(a) Prof(a) Dr(a) Roberta Tarkany Basting Hofling

Entregue na Secretaria de Pós-graduação do CPO - São Leopoldo Mandic, no dia 08/05/2006, com número de protocolo nº 06/161, foi APROVADO pelo Comitê de Ética e Pesquisa instituído nesta Universidade de acordo com a resolução 196 /1.996 do CNS - Ministério da Saúde, em reunião realizada no dia 04/10/2006.

Cordialmente



**Prof. Dr. Thomaz Wassall
Coordenador de Pós-Graduação**